

Involvement of platelet cytoskeleton and plasma membrane in the expression of procoagulant activity

Citation for published version (APA):

Verhallen, P. F. J. (1988). *Involvement of platelet cytoskeleton and plasma membrane in the expression of procoagulant activity*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg.
<https://doi.org/10.26481/dis.19881118pv>

Document status and date:

Published: 01/01/1988

DOI:

[10.26481/dis.19881118pv](https://doi.org/10.26481/dis.19881118pv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

SUMMARY

Blood platelets play a multifaceted role in the arrest of bleeding upon vessel wall injury. Normally, platelets circulate in the blood stream as quiescent cells. Upon vessel wall injury, platelets become activated: they adhere to the uncovered subendothelial fibrils (adhesion), secrete their granular contents (release reaction), and stick to each other (aggregation) to form a primary hemostatic plug. The primary platelet plug is consolidated by fibrin, which is formed upon initiation of the coagulation cascade, a process which is dramatically accelerated by activated platelets. Finally, contractile mechanisms in platelets lead to clot contraction.

Research in the group of professor Zwaal is concentrates on the acceleration of coagulation by activated human blood platelets. This property of activated platelets is referred to as procoagulant activity, and can easily be measured by the conversion of prothrombin to thrombin by the enzymatic complex of factor X_a and V_a , under conditions at which the procoagulant activity of the platelet is rate limiting. Routinely, purified coagulation factors are used, and the amount of thrombin formed is determined with a chromogenic substrate.

Not all platelet activators are equally potent in stimulation of procoagulant activity. Thrombin is a moderate and collagen is an efficient stimulator of procoagulant activity. Most potent, however, is the combination of collagen and thrombin. The condition of two powerful platelet activators could mean that coagulation is accelerated especially at the site of vessel wall injury.

Previous research showed that negatively charged phospholipids, like phosphatidylserine,

are responsible for the procoagulant activity of the platelet surface. In a quiescent platelet, phospholipids are asymmetrically distributed over the plasma membrane (transmembrane asymmetry), in such a way that phosphatidylserine is virtually confined to the intracellular side of the plasma membrane. This means that phosphatidylserine has to cross the plasma membrane during platelet activation. The molecular and cellular mechanisms involved in the transmembrane movement (flipflop) of phosphatidylserine have been the research subject of this thesis. Initial investigation of platelet protein patterns after gel electrophoresis showed that the potency of various platelet activators to induce procoagulant activity correlated with the extent of degradation of cytoskeletal proteins by a Ca^{2+} -dependent protease (calpain).

The involvement of the cytoskeleton in the expression of platelet procoagulant activity was further investigated by comparing the appearance of phosphatidylserine at the platelet surface with the degradation of cytoskeletal proteins by calpain, at various conditions (chapter 2). The rate of both processes was compared after treatment of platelets by a Ca^{2+} ionophore, the combination collagen and thrombin, and the local anesthetics dibucaine and tetracaine. It was found that on a time-scale of less than one minute, several minutes, and almost one hour, respectively, the generation of procoagulant activity followed an identical course as the generation of calpain activity. The observed similarity suggests that both activities are related. This suggestion was further investigated employing the Ca^{2+} -dependence of calpain. Platelets were activated by a Ca^{2+} iono-

phore, while extracellular Ca^{2+} was controlled with the aid of Ca^{2+} buffers. It was found that the Ca^{2+} -dependence of calpain was almost identical with that of the appearance of procoagulant activity, again indicative of a relation between these processes.

A different approach to investigate the relation between flipflop of phosphatidylserine and degradation of cytoskeletal proteins by calpain was found in the use of fluoride-treated platelets. It appeared that during treatment with fluoride, platelets temporarily increase the permeability of their plasma membrane towards Ca^{2+} . When these fluoride-treated platelets subsequently become exposed to Ca^{2+} , their intracellular Ca^{2+} levels will rise to an extent determined by the current Ca^{2+} permeability of their plasma membranes. Comparison of the generation of procoagulant activity and calpain activity after addition of Ca^{2+} again showed a close resemblance. Convincing evidence for a relation between flipflop of phosphatidylserine and degradation of cytoskeletal proteins was obtained by addition of leupeptin, a specific inhibitor of calpain, during the fluoride treatment. It was found that inhibition of calpain resulted in inhibition of procoagulant activity.

Another clue for a relation between the structure of the cytoskeleton and the asymmetric distribution of phospholipids over the plasma membrane was obtained with the aid of artificial vesicles, pinched off from the platelet plasma membrane (chapter 4). Addition of a synthetic lipid which spontaneously incorporates into the plasma membrane renders the membrane instable, resulting in extrusion of abundant lipid in the form of a plasma membrane vesicle (spicule). These spicules have lost their transmembrane lipid asymmetry. In addition, the composition of their cytoskeletal proteins has changed. These findings can be explained in terms of a relation between cytoskeletal organization and transmembrane lipid asymmetry.

The molecular mechanisms of transmembrane movement of phosphatidylserine during the generation of platelet procoagulant activity were investigated employing the fluorescent amphiphilic membrane probe TMA-DPH (trimethylammonium-diphenylhexatriene). When TMA-DPH is added to suspended platelets, part of it will immediately incorporate into the outer leaflet of the plasma membrane where it

strongly fluoresces, while most of it will stay in solution where it is not fluorescent.

At first, the fluorescence properties of TMA-DPH in unstimulated platelets were investigated employing advanced fluorimetric techniques (chapter 5). These techniques allow detailed determination of the structural properties of the membrane in the vicinity of TMA-DPH. After addition to unstimulated platelets, TMA-DPH will slowly diffuse into the platelet interior, which is evidenced by an increase in fluorescence due to uptake of TMA-DPH from the solution. Monitoring the fluorescence properties of TMA-DPH during its penetration into the platelet, showed that the structure of intracellular membranes is much more fluid than that of the outer leaflet of the plasma membrane. Comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH in various model membranes suggested that an uneven distribution of cholesterol in the platelet is the cause of the observed differences in membrane fluidity. It is concluded that the outer leaflet of the plasma membrane contains about 3 times more cholesterol than the cytosolic leaflet.

Changes in the fluorescence properties of TMA-DPH during stimulation of platelets are described in chapter 6. Stimulation of platelets by a Ca^{2+} ionophore resulted in a rapid increase in fluorescence intensity to the level of lysed platelets. This finding indicates that when phosphatidylserine moves rapidly from the inner side to the outer side of the plasma membrane, TMA-DPH moves rapidly into the platelet. This can be explained by assuming that during generation of platelet procoagulant activity the molecular structure of the plasma membrane becomes locally disturbed. Along these membrane disturbances (flipsites) lipids and lipid-like molecules can rapidly move from either side of the plasma membrane to the other. Further information about the properties of these flipsites was obtained by investigation of their lifetime and Ca^{2+} -dependence. Addition of TMA-DPH 1 minute after the Ca^{2+} ionophore showed that the flipsites were no longer present. Determination of the Ca^{2+} -dependence of the generation of flipsites, measured in the same way as the Ca^{2+} -dependence of cytoskeletal degradation and procoagulant activity, showed a close similarity with the Ca^{2+} -dependence of calpain.

In conclusion, the findings described in this thesis can be explained with the following

model. In unstimulated platelets the transmembrane lipid asymmetry is dependent on a direct interaction of specific cytoskeletal proteins with anionic lipids of the plasma membrane. Stimulation of platelets by the combined action of collagen and thrombin will lead to activation of calpain. Limited proteolysis of cytoskeletal proteins by calpain results in loss of the stabilizing

influence of these proteins on the membrane structure. As a consequence, the membrane lipids will immediately reorganize resulting in a loss of transmembrane lipid asymmetry. Phosphatidylserine, present at the platelet surface, can participate in the acceleration of blood coagulation.

SAMENVATTING

Bloedplaatjes spelen een veelzijdige rol in het stelpen van bloedingen. Normaal gesproken wordt een bloedplaatje in een inactieve toestand meegevoerd door de bloedstroom. Zodra echter een bloedvat beschadigd wordt, raken bloedplaatjes geactiveerd: ze binden aan het blootgelegde bindweefsel (adhesie), scheiden de inhoud van hun granula uit (release reactie), en klonteren samen (aggregatie) tot een primaire bloedprop. Tevens kunnen geactiveerde bloedplaatjes de bloedstolling versnellen. Het gevormde fibrine bindt de bloedplaatjes aan elkaar tot een stevige prop (secundaire bloedprop), die samentrekt door een contractie proces in de bloedplaatjes.

Het onderzoek in de groep van professor Zwaal concentreert zich op het versnellen van de bloedstolling door geactiveerde humane bloedplaatjes. Deze eigenschap van geactiveerde bloedplaatjes wordt procoagulant activiteit genoemd, en kan gemakkelijk worden afgeleid uit de snelheid waarmee prothrombine omgezet wordt door factor X_a en V_a in thrombine. Routinematig worden hiervoor gezuiverde stollingsfactoren gebruikt, en wordt de hoeveelheid gevormde thrombine bepaald met een chromogeen substraat.

Niet alle stimulators van bloedplaatjes zijn even goed in staat de procoagulant activiteit op te wekken. Thrombine is een matige en collageen is een goede stimulator van de procoagulant activiteit. De combinatie van collageen met thrombine vormt echter het sterkste fysiologische signaal voor het opwekken van de procoagulant activiteit. De noodzaak voor twee krachtige plaatjes activatoren zou kunnen betekenen dat de vorming van thrombine vooral

versneld wordt door de plaatjes op de plaats van beschadiging van de vaatwand.

In het verleden is gebleken dat negatief geladen fosfolipiden, zoals fosfatidylserine, verantwoordelijk zijn voor de procoagulant activiteit. In een inactief bloedplaatje zijn de fosfolipiden asymmetrisch verdeeld over beide zijden van het plasma membraan (transmembraan asymmetrie), waarbij fosfatidylserine zich vrijwel uitsluitend aan de binnenkant van het plasma membraan bevindt, en dus tijdens de plaatjes activatie door het membraan naar buiten moet bewegen. De moleculaire en cellulaire processen betrokken bij de transmembraan beweging (flipflop) van fosfolipiden zijn onderwerp van het promotie-onderzoek geweest. Onderzoek naar veranderingen in eiwitpatronen met behulp van gelelektroforese, liet in eerste instantie zien dat de mate van procoagulant activiteit, opgewekt door verschillende plaatjes activatoren, correleerde met de mate van afbraak van cytoskelet eiwitten door een Ca^{2+} afhankelijke protease (calpaine) in het bloedplaatje.

De rol van het cytoskelet tijdens het opwekken van procoagulant activiteit in bloedplaatjes is nader onderzocht door het naar buiten komen van fosfatidylserine te vergelijken met de afbraak van cytoskeleteiwitten door calpaine, onder verschillende omstandigheden (hoofdstuk 2). Zo werd de vormingssnelheid van beide processen vergeleken na behandeling van bloedplaatjes met een Ca^{2+} ionofoor, met de combinatie collageen & thrombine, en met lokale anesthetica (dibucaine, tetracaine). Het bleek dat op een tijdschaal van respectievelijk minder dan één minuut, enkele minuten, en bijna één uur, het opkomen van

procoagulant activiteit en calpaine activiteit parallel liep. Deze correlatie suggereert dat beide activiteiten iets met elkaar te maken hebben. Die suggestie werd onderzocht door gebruik te maken van de Ca^{2+} afhankelijkheid van calpaine. Bloedplaatjes werden geactiveerd met een Ca^{2+} ionofoor terwijl extracellulair Ca^{2+} gemanipuleerd werd met behulp van Ca^{2+} buffers. Gevonden werd dat de Ca^{2+} afhankelijkheid van calpaine vrijwel identiek was aan die van het opwekken van procoagulant activiteit, hetgeen opnieuw suggereert dat deze processen met elkaar verbonden zijn.

Een andere manier om de relatie tussen flipflop van fosfatidylserine en afbraak van cytoskeleteiwitten te onderzoeken werd gevonden in bloedplaatjes behandeld met fluoride (hoofdstuk 3). Het bleek dat behandeling met fluoride in afwezigheid van Ca^{2+} , tijdelijk de Ca^{2+} permeabiliteit van het plasma membraan verhoogt. Wanneer deze behandelde bloedplaatjes vervolgens worden blootgesteld aan Ca^{2+} , zal dit Ca^{2+} naar binnen stromen en het plaatje activeren. Onderzoek naar ontstaan van calpaine activiteit en procoagulant activiteit na toevoeging van Ca^{2+} , liet weer zien dat beide parallel liepen. Een sterker bewijs voor een verband tussen cytoskelet afbraak en flipflop van fosfatidylserine werd verkregen door tijdens de fluoride behandeling een remmer van calpaine toe te voegen. Het bleek dat remming van calpaine resulteerde in remming van procoagulant activiteit, een duidelijke indicatie dat afbraak van cytoskelet eiwitten op een of andere manier verantwoordelijk is voor de flipflop van fosfatidylserine.

Een volgende aanwijzing voor een verband tussen de structuur van het cytoskelet en de transmembraan lipiden asymmetrie werd verkregen met behulp van kunstmatige membraan structuren, afgesplitst van het bloedplaatje (hoofdstuk 4). Door toevoegen van synthetisch lipid dat spontaan in het membraan incorporeert, wordt het plasma membraan onstabiel, en zal de overmaat lipid afgesplitst worden in de vorm een klein bolletje omsloten door het afgesplitste membraan (spicule). Het bleek dat in deze spicules de transmembraan lipiden asymmetrie verloren is gegaan. Dit gaat gepaard met een afwijking in de samenstelling van het cytoskelet, met name het eiwit myosine is vrijwel geheel afwezig in de spicules.

Inzicht in het moleculaire mechanisme van transmembraan beweging van fosfolipiden

tijdens het procoagulant worden van bloedplaatjes vereiste een andere aanpak. Gekozen werd voor het gebruik van een fluorescent amfifiel molecuul, TMA-DPH (trimethylammonium-difenyhexatriën), als membraan sonde. Een klein gedeelte van het TMA-DPH dat toegevoegd wordt aan inactieve bloedplaatjes, wordt zeer snel opgenomen in de buitenste laag van het plasma membraan waar het fluoresceert, terwijl het merendeel in oplossing blijft waar het niet fluoresceert.

In eerste instantie werd TMA-DPH in een niet-gestimuleerd bloedplaatje onderzocht met geavanceerde fluorescentie technieken (hoofdstuk 5). Met deze technieken is het mogelijk uit de fluorescentie eigenschappen van TMA-DPH af te leiden hoe de membraanstructuur in de omgeving van TMA-DPH er uit ziet. Na toevoeging aan bloedplaatjes zal TMA-DPH langzaam naar binnen diffunderen. Dit gaat gepaard met een geleidelijke toename in de fluorescentie intensiteit als gevolg van opname van TMA-DPH uit de oplossing. Door de fluorescentie eigenschappen van TMA-DPH te volgen terwijl het langzaam het bloedplaatje binnendringt, werd gevonden dat de membraanstructuur binnen in het bloedplaatje veel vloeibaarder is dan aan de buitenkant van het plasma membraan. Vergelijking van de fluorescentie eigenschappen van TMA-DPH in verschillende model membranen met bekende samenstelling, suggereerde dat een ongelijkmatige verdeling van cholesterol in het bloedplaatje de oorzaak moest zijn van de gevonden verschillen in vloeibaarheid. Hieruit werd de conclusie getrokken dat de buitenzijde van het plasma membraan ongeveer 3 maal zoveel cholesterol bevat als de binnenzijde.

Onderzoek naar veranderingen in fluorescentie eigenschappen van TMA-DPH als gevolg van bloedplaatjes activatie (hoofdstuk 6), liet zien dat activatie met de Ca^{2+} ionofoor een snelle toename in de fluorescentie intensiteit tot gevolg heeft, tot het niveau van gelyseerde plaatjes die totaal verzadigd zijn met TMA-DPH. Met andere woorden, tijdens activatie van bloedplaatjes door een Ca^{2+} ionofoor, waarbij fosfatidylserine snel over het plasma membrane naar buiten beweegt, beweegt TMA-DPH zich snel naar binnen toe. Dit kan verklaart worden door aan te nemen dat tijdens het opwekken van procoagulant activiteit in bloedplaatjes, de lipiden bilaag structuur van het plasma membraan op moleculair niveau verstoord raakt. Langs deze membraan verstoringen (flipsites)

kunnen dan lipiden snel dwars over het membraan bewegen. Nadere informatie over de eigenschappen van de flipsites werd verkregen door onderzoek naar hun levensduur en de Ca^{2+} afhankelijkheid. Toevoeging van TMA-DPH aan bloedplaatjes één minuut ná de Ca^{2+} ionofoor, liet zien dat de flipsites niet meer aanwezig waren. De Ca^{2+} afhankelijkheid van de generatie van flipsites, gemeten op dezelfde manier als beschreven voor cytoskelet afbraak en procoagulant activiteit, kwam overeen met die van calpaine.

Concluderend, kunnen de hier beschreven waarnemingen met het volgende model verklaart worden. In een inactief bloedplaatje

wordt de transmembraan lipiden asymmetrie mede gehandhaafd door interactie van bepaalde cytoskelet eiwitten met de lipiden laag. Stimulatie van bloedplaatjes door een combinatie van collageen en thrombine leidt tot activering van calpaine, dat bepaalde cytoskelet eiwitten in fragmenten afbreekt. Hierdoor komt de stabiliserende invloed van die cytoskelet eiwitten te vervallen, en zal het membraan zich ogenblikkelijk reorganiseren, resulterend in een verlies van transmembraan lipiden asymmetrie. Het fosfatidylserine dat nu ook aan de buitenkant van het plasma membraan zit zal daar de bloedstolling kunnen versnellen.